

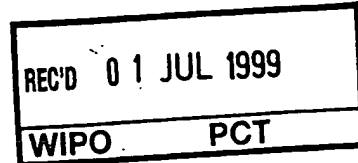
50

PCT/EP 99 / 0314

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



EP 99 / 3141

Bescheinigung

Die Hoechst Schering AgrEvo GmbH in Berlin/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Nucleinsäuremoleküle codierend Enzyme aus Weizen, die an der Stärkesynthese beteiligt sind"

am 8. Mai 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 12 N, C 07 H und A 01 H der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

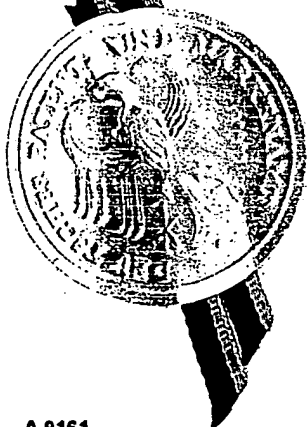
München, den 29. April 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 198 20 608.9



Joost

Nucleinsäuremoleküle codierend Enzyme aus Weizen, die an der Stärkesynthese beteiligt sind

Die vorliegende Erfindung betrifft Nucleinsäuremoleküle, die ein Enzym aus Weizen codieren, das an der Stärkesynthese in Pflanzen beteiligt ist. Bei diesem Enzym handelt es sich um eine Isoamylase.

Weiterhin betrifft diese Erfindung Vektoren, Wirtszellen, sowie Pflanzenzellen und Pflanzen, die die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen enthalten.

ferner werden Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen beschrieben, die aufgrund der Einführung von erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen eine in ihren Eigenschaften veränderte Stärke synthetisieren.

Im Hinblick auf die zunehmende Bedeutung, die pflanzlichen Inhaltsstoffen als erneuerbaren Rohstoffquellen in letzter Zeit beigemessen wird, ist es eine der Aufgaben der biotechnologischen Forschung, sich um eine Anpassung dieser pflanzlichen Rohstoffe an die Anforderungen der verarbeitenden Industrie zu bemühen. Um eine Anwendung von nachwachsenden Rohstoffen in möglichst vielen Einsatzgebieten zu ermöglichen, ist es darüber hinaus erforderlich, eine große Stoffvielfalt zu erreichen.

Leben Ölen, Fetten und Proteinen stellen Polysaccharide die wesentlichen nachwachsenden Rohstoffe aus Pflanzen dar. Eine zentrale Stellung bei den Polysacchariden nimmt neben Cellulose die Stärke ein, die einer der wichtigsten Speicherstoffe in höheren Pflanzen ist. Hierbei ist Weizen eine der wichtigsten Kulturpflanzen, da ca. 20 % der Gesamtstärkeproduktion der Europäischen Gemeinschaft aus ihr gewonnen werden.

Das Polysaccharid Stärke ist ein Polymer aus chemisch einheitlichen

Grundbausteinen, den Glucosemolekülen. Es handelt sich dabei jedoch um ein sehr komplexes Gemisch aus unterschiedlichen Molekülformen, die sich hinsichtlich ihres Polymerisationsgrades des Auftretens von Verzweigungen der Glucoseketten und deren Kettenlängen unterscheiden, die darüber hinaus derivatisiert, z.B.

phosphoryliert sein können. Daher stellt Stärke keinen einheitlichen Rohstoff dar.

Man unterscheidet insbesondere die Amylose-Stärke, ein im wesentlichen

unverzweigtes Polymer aus α -1,4-glycosidisch verknüpften Glucosemolekülen, von der Amylopektin-Stärke, die ihrerseits ein komplexes Gemisch aus unterschiedlich verzweigten Glucoseketten darstellt. Die Verzweigungen kommen dabei durch das

Auftreten von zusätzlichen α -1,6-glycosidischen Verknüpfungen zustande. In

Weizen besteht die synthetisierte Stärke zu ca. 11 bis 37 % aus Amylose-Stärke.

Um eine möglichst vielfältige Anwendung von geeigneten Stärken für

unterschiedlichste industrielle Bedürfnisse zu ermöglichen, ist es wünschenswert,

Pflanzen zur Verfügung zu stellen, die in der Lage sind, modifizierte Stärken zu

synthetisieren, die für verschiedene Verwendungszwecke besonders gut geeignet

sind. Eine Möglichkeit, derartige Pflanzen bereitzustellen, besteht in züchterischen

Maßnahmen. Die züchterischen Einflußnahme erweist sich beim Weizen aufgrund

seines polyploiden Charakters (tetra- und hexaploid) jedoch sehr schwer. Erst

kürzlich gelang durch Kreuzung natürlich auftretender Mutanten die Herstellung

eines "waxy" (Amylose-freien) Weizens (Nakamura et al., Mol. Gen. Genet. 248 (1995), 253-259).

Eine Alternative zu züchterischen Verfahren besteht in der gezielten Modifikation

stärkeproduzierender Pflanzen durch gentechnologische Methoden. Voraussetzung

hierfür ist jedoch die Identifizierung und Charakterisierung der an der

Stärkesynthese und/oder Stärkemodifikation beteiligten Enzyme sowie die

Isolierung der diese Enzyme codierenden Nucleinsäuremoleküle.

Die biochemischen Synthesewege, die zum Aufbau von Stärke führen, sind im

wesentlichen bekannt. Die Stärkesynthese in pflanzlichen Zellen findet in den Plastiden statt. In photosynthetisch aktiven Geweben sind dies die Chloroplasten, in photosynthetisch inaktiven, stärkespeichernden Geweben die Amyloplasten.

Für eine weitere gezielte Veränderung des Verzweigungsgrades von in Pflanzen synthetisierter Stärke mit Hilfe gentechnischer Verfahren ist es nach wie vor erforderlich, DNA-Sequenzen zu identifizieren, die Enzyme codieren, die am Stärkemetabolismus, insbesondere an der Einführung oder am Abbau von Verzweigungen innerhalb der Stärkemoleküle, beteiligt sind.

Neben den sog. α -Enzymen, die Verzweigungen in Stärkemoleküle einführen, kommen in Pflanzen Enzyme vor, die Verzweigungen auflösen können. Diese Enzyme werden als Debranching-Enzyme bezeichnet und werden entsprechend ihrer Substratspezifität in drei Gruppen eingeteilt:

- (a) Die Pullulanasen, die neben Pullulan auch Amylopektin als Substrat nutzen, kommen in Mikroorganismen, z.B. *Klebsiella*, und in Pflanzen vor. In Pflanzen werden diese Enzyme auch als R-Enzyme bezeichnet.
- (b) Die Isoamylasen, die nicht Pullulan, wohl aber Glycogen und Amylopektin als Substrat nutzen, kommen ebenfalls in Mikroorganismen und Pflanzen vor. Isoamylasen wurden beispielsweise in Mais (Manners & Carbohydr. Res. 9 (1969), 107) und Kartoffel (Ishizaki et al., Agric. Biol. Chem. 47 (1983), 771-779) beschrieben.
- (c) Die Amylo-1,6-Glucosidasen sind in Säugern und Hefen beschrieben und nutzen Grenzextrine als Substrat.

n Zuckerrüben konnte von Li et al. (Plant Physiol. 98 (1992), 1277-1284) neben fünf Endo- und zwei Exoamylasen nur ein Debranching-Enzym vom Pullulanase-Typ nachgewiesen werden. Dieses Enzym, das eine Größe von ca. 100 kD und ein pH-Optimum von 5,5 aufweist, ist in den Chloroplasten lokalisiert. Auch für Spinat wurde ein Debranching-Enzym beschrieben, das Pullulan als Substrat verwendet. Sowohl das Debranching-Enzym aus Spinat als

auch das aus der Zuckerrübe besitzen bei der Reaktion mit Amylopektin als Substrat verglichen mit Pullulan als Substrat, eine 5-fach geringere Aktivität (Ludwig et al., Plant Physiol. 74 (1984), 856-861; Li et al., Plant Physiol. 98 (1992), 1277-1284).

- 5 Bei der landwirtschaftlich wichtigen stärkespeichernden Kulturpflanze Kartoffel wurde die Aktivität eines Debranching-Enzyms von Hobson et al. (J. Chem. Soc., (1951), 1451) untersucht. Es gelang der Nachweis, daß das entsprechende Enzym im Gegensatz zum α -1,6-glycosidische Bindungen hydrolysiert. Aktivität besitzt, sondern lediglich α -1,6-glycosidische Bindungen hydrolysiert.
- 10 Das Enzym konnte jedoch bisher nicht genauer charakterisiert werden. Im Fall der Kartoffel wurden bereits Verfahren zur Reinigung des Debranching-Enzyms sowie partielle Peptidsequenzen des gereinigten Proteins vorgeschlagen (WO 95/04826). Für Spinat wurde inzwischen die Reinigung eines Debranching-Enzyms, sowie die Isolierung einer entsprechenden cDNA beschrieben (Renz et al., Plant Physiol. 108 (1995), 1342).
- 15

- 20 Für Mais wurde bisher in der Literatur lediglich die Existenz eines Debranching-Enzyms beschrieben. Dieses wird aufgrund seiner Substratspezifität in die Gruppe der Isoamylasen eingeordnet (siehe z.B. Hannah et al., Scientia Horticulturæ 55 (1993), 177-197 oder Garwood (1984) in Starch Chemistry and Technology, Whistler, R.L., BeMiller, J.N., Puschall, E.F. (eds.), Academic Press San Diego, New York, Boston, 25-86). Die entsprechende Mutante wird als (sugary) bezeichnet. Das Gen des sugary-Locus wurde kürzlich kloniert (siehe James et al., Plant Cell 7 (1995), 417-429). Neben dem sugary-Locus ist bisher in Mais kein anderer Genlocus bekannt, der ein Protein mit Debranching-Enzymaktivität codiert. Es gab bisher auch keinerlei Hinweise, daß andere Debranching-Enzymformen in Mais vorkommen. Will man transgene Maispflanzen herstellen, die keinerlei Debranching-Enzymaktivitäten mehr aufweisen, z.B. um eine Verlängerung des Verzweigungsgrades der Amylopektinstärke zu erzielen, so ist es erforderlich, alle in Mais vorkommenden
- 25
- 30

Debranching-Enzymformen zu identifizieren und die entsprechenden Gene oder cDNA-Sequenzen zu isolieren.

5

- 10 Um weitere Möglichkeiten bereitzustellen, beliebige stärke-speichernde Pflanzen, vorzugsweise Getreide, insbesondere Weizen, dahingehend zu verändern, daß sie eine modifizierte Stärke synthetisieren, ist es erforderlich, jeweils DNA-Sequenzen zu identifizieren, die weitere Isoformen von Verzweigungsenzymen codieren.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde,

- 15 Nucleinsäuremoleküle zur Verfügung zu stellen, die an der Stärkebiosynthese beteiligte Enzyme codieren und mit deren Hilfe es möglich ist, gentechnisch modifizierte Pflanzen herzustellen, die die Herstellung von in ihren chemischen und/oder physikalischen Eigenschaften veränderten pflanzlichen Stärken ermöglichen.

20

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst.

- 25 Die vorliegende Erfindung betrifft daher Nucleinsäuremoleküle, die Proteine mit der Funktion einer Isoamylase aus Weizen, wobei derartige Moleküle vorzugsweise Proteine codieren, die im wesentlichen die unter Seq ID No. 3 angegebene Aminosäuresequenz umfassen. Insbesondere betrifft die Erfindung Nucleinsäuremoleküle, die die unter Seq ID No. 1 angegebene Nucleotidsequenz oder einen Teil davon, bevorzugt Moleküle, die die in Seq ID No. 1 angegebene codierende Region sowie entsprechende (korrespondierende) Ribonucleotidsequenzen enthalten.

30

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Nucleinsäuremoleküle, die mit einem der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle hybridisieren.

5

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls Nucleinsäuremoleküle, die eine Isoamylase aus Weizen codieren und deren Sequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von den Nucleotidsequenzen der oben beschriebenen Moleküle abweicht.

10

Die Erfindung betrifft auch Nucleinsäuremoleküle, die eine Sequenz aufweisen, die zu der gesamten oder einem Teil einer der obengenannten Sequenzen komplementär ist.

Der Begriff "Hybridisierung" bedeutet im Rahmen dieser Erfindung eine

15

Hybridisierung unter konventionellen Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen, wie sie beispielsweise in Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) beschrieben sind.

20

Besonders bevorzugt erfolgt eine "Hybridisierung", unter den folgenden Bedingungen:

Hybridisierungspuffer: 2 x SSC; 10 x Denhardt-Lösung (Fikoll 400 + PEG + BSA, Verhältnis 1:1:1); 0,1% SDS; 5 mM EDTA; 50 mM

Na_2HPO_4 ; 250 µg/ml Heringssperma-DNA; 50 µg/ml

iRNA; oder

0,25 M Natriumphosphatpuffer pH 7,2;

1 mM EDTA

7% SDS

Hybridisierungstemperatur T = 65 bis 68 °C

Waschpuffer:

0,2 x SSC; 0,1% SDS

30

Nucleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisieren, können prinzipiell Isoamylasen aus jeder beliebigen Weizenpflanze codieren, die derartige Proteine exprimiert.

Nucleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Molekülen hybridisieren, können z. B. aus genomischen oder aus cDNA-Bibliotheken von Weizen oder Weizenpflanzengewebe isoliert werden. Alternativ können sie durch gentechnische Methoden oder durch chemische Synthese hergestellt werden.

Die Identifizierung und Isolierung derartiger Nucleinsäuremoleküle kann dabei unter Verwendung der erfindungsgemäßen Moleküle oder Teile dieser Moleküle bzw. der inversen Komplemente dieser Moleküle erfolgen, z. B. mittels Hybridisierung nach Standardverfahren (siehe z. B. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Als Hybridisierungsprobe können z. B. Nucleinsäuremoleküle verwendet werden, die exakt die oder im wesentlichen die unter Seq ID No. 1 angegebene Nucleotidsequenz oder Teile dieser Sequenz aufweisen. Bei den als Hybridisierungsprobe verwendeten Fragmenten kann es sich auch um synthetische Fragmente handeln, die mit Hilfe der gängigen Synthesetechniken hergestellt wurden und deren Sequenz im wesentlichen mit der eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls übereinstimmt.

Die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisierenden Moleküle umfassen auch Fragmente. Derivate und allelische Varianten der oben beschriebenen Nucleinsäuremoleküle, die eine erfindungsgemäße Isoamylase aus Weizen codieren. Unter Fragmenten werden dabei Teile der Nucleinsäuremoleküle

verstanden, die lang genug sind, um eines der beschriebenen Proteine zu codieren. Der Ausdruck Derivat bedeutet in diesem Zusammenhang, daß die Sequenzen dieser Moleküle sich von den Sequenzen der oben beschriebenen Nucleinsäuremoleküle an einer oder mehreren Positionen unterscheiden und einen hohen Grad an Homologie zu diesen Sequenzen aufweisen. Homologie bedeutet dabei eine Sequenzidentität von mindestens 40 %, insbesondere eine Identität von mindestens 60 %, vorzugsweise über 80 % und besonders bevorzugt über 90 %. Die Abweichungen zu den oben beschriebenen Nucleinsäuremolekülen können dabei durch Deletion, Substitution, Insertion oder Rekombination entstanden sein.

Homologie bedeutet ferner, daß funktionelle und/oder strukturelle Äquivalenz zwischen den betreffenden Nucleinsäuremolekülen oder den durch sie codierten Proteinen, besteht. Bei den Nucleinsäuremolekülen, die homolog zu den oben beschriebenen Molekülen sind und Derivate dieser Moleküle darstellen, handelt es sich in der Regel um Variationen dieser Moleküle, die Modifikationen darstellen, die dieselbe biologische Funktion ausüben. Es kann sich dabei sowohl um natürlicherweise auftretende Variationen handeln, beispielsweise um Sequenzen aus anderen Organismen, oder um Mutationen, wobei diese Mutationen auf natürliche Weise aufgetreten sein können oder durch gezielte Mutagenese eingeführt wurden. Ferner kann es sich bei den Variationen um synthetisch hergestellte Sequenzen handeln. Bei den allelischen Varianten kann es sich sowohl um natürlich auftretende Varianten handeln, als auch um synthetisch hergestellte oder durch rekombinante DNA-Techniken erzeugte Varianten.

Die von den verschiedenen Varianten der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codierten Isoamylasen weisen bestimmte gemeinsame Charakteristika auf. Dazu können z. B. Enzymaktivität, Molekulargewicht, immunologische Reaktivität, Konformation etc. gehören, sowie physikalische Eigenschaften wie z. B. das Laufverhalten in Gelelektrophoresen, chromatographisches Verhalten, Sedimentationskoeffizienten, Löslichkeit,

spektroskopische Eigenschaften, Ladungseigenschaften, Stabilität, pH-Optimum, Temperatur-Optimum etc.

- 5 Bei dem durch die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codierten Protein handelt es sich um eine Isoamylase aus Weizen. Diese Proteine weisen gewisse Homologiebereiche zu bisher bekannten Isoamylasen aus anderen Pflanzenarten auf.

- 10 Bei den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen kann es sich um DNA-Moleküle handeln, insbesondere um cDNA- oder genomische Moleküle. Ferner können die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle RNA-Moleküle sein. Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können z. B. aus natürlichen Quellen gewonnen sein, oder durch rekombinante Techniken oder synthetisch hergestellt sein.

- 15 Gegenstand der Erfindung sind auch Oligonucleotide, die spezifisch mit einem erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül hybridisieren. Derartige Oligonucleotide haben vorzugsweise eine Länge von mindestens 10, insbesondere von mindestens 15 und besonders bevorzugt von mindestens 50 Nucleotiden. Die erfindungsgemäßen Oligonucleotide sind dadurch gekennzeichnet, daß sie spezifisch mit erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisieren, d.h. nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß mit Nucleinsäuresequenzen, die andere Proteine, insbesondere andere Isoamylasen codieren. Die erfindungsgemäßen Oligonucleotide können beispielsweise als Primer für eine PCR-Reaktion verwendet werden oder als Hybridisierungsprobe für die Isolierung verwandter Gene. Ebenso können sie Bestandteile von antisense-Konstrukten sein oder von DNA-Molekülen, die für geeignete Ribozyme codieren.

- 5 Ferner betrifft die Erfindung Vektoren, insbesondere Plasmide, Cosmide, Viren, Bacteriophagen und andere in der Gentechnik gängige Vektoren, die die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle enthalten. Derartige Vektoren sind zur Transformation pro- oder eukaryontischer, vorzugsweise pflanzlicher Zellen geeignet.

- 10 Vorzugsweise besonders bevorzugt erlauben sie die Integration der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle, gegebenenfalls zusammen mit flankierenden regulatorischen Regionen, in das Genom der Pflanzenzelle. Beispiele hierfür sind binäre Vektoren, die bei dem Agrobakterien-vermittelten Gentransfer eingesetzt werden können.

- 15 Der Begriff "Vektor" bezeichnet im allgemeinen ein geeignetes, dem Fachmann bekanntes Hilfsmittel, das den gezielten Transfer eines ein- oder doppelsträngigen Nucleinsäuremoleküls in eine Wirtszelle ermöglicht, beispielsweise einen DNA- oder RNA-Virus, ein Virusfragment, ein Plasmidkonstrukt, das in An- oder Abwesenheit von regulatorischen Elementen zum Nucleinsäure-Transfer in Zellen geeignet sein kann. Trägermaterialien wie Glasfaser oder auch Metallpartikel wie sie z.B. beim "particle gun"-Verfahren eingesetzt werden können, er kann aber auch ein Nucleinsäuremolekül umfassen, das durch chemische oder physikalische Verfahren direkt in eine Zelle gebracht werden kann.

- 20 In einer bevorzugten Ausführungsform sind die in den Vektoren enthaltenen Nucleinsäuremoleküle verknüpft mit regulatorischen Elementen, die die Transkription und Synthese einer translatierbaren RNA in pro- oder eukaryontischen Zellen gewährleisten.

- 30 Die Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in prokaryontischen Zellen, beispielsweise in *Escherichia coli*, ist insofern interessant, als daß auf diese

weise eine genauere Charakterisierung der enzymatischen Aktivitäten der Enzyme, für die diese Moleküle codieren, ermöglicht wird. Es ist insbesondere möglich, das Produkt, das von den entsprechenden Enzymen in Abwesenheit anderer, in der pflanzlichen Zelle an der Stärkesynthese beteiligter Enzyme synthetisiert wird, zu charakterisieren. Dies läßt Rückschlüsse zu auf die Funktion, die das entsprechende Protein bei der Stärkesynthese in der Pflanzenzelle ausübt.

Darüber hinaus ist es möglich, mittels gängiger molekularbiologischer Techniken (siehe z.B. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) verschiedenartige Mutationen in die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle einzuführen, wodurch die Synthese von Proteinen mit eventuell veränderten biologischen Eigenschaften kommt. Hierbei ist zum einen die Erzeugung von Deletionsmutanten möglich, bei denen durch fortschreitende Deletionen vom 5'- oder vom 3'-Ende der codierenden DNA-Sequenz Nucleinsäuremoleküle erzeugt werden, die zur Synthese entsprechend verkürzter Proteine führen. Durch derartige Deletionen am 5'-Ende der Nucleotidsequenz ist es beispielsweise möglich, Aminosäuresequenzen zu identifizieren, die für die Translokation des Enzyms in die Plastiden verantwortlich sind (Transilpeptide). Dies erlaubt es, gezielt Enzyme herzustellen, die durch Entfernen der entsprechenden Sequenzen nicht mehr in den Plastiden, sondern im Cytosol lokalisiert sind, oder aufgrund der Addition von anderen Signalsequenzen in anderen Kompartimenten lokalisiert sind.

Andererseits ist auch die Einführung von Punktmutationen denkbar an Positionen, die denen eine Veränderung der Aminosäuresequenz einen Einfluß beispielsweise auf die Enzymaktivität oder die Regulierung des Enzyms hat. Auf diese Weise können z.B. Mutanten hergestellt werden, die einen veränderten K_m -Wert besitzen, der nicht mehr den normalerweise in der Zelle vorliegenden Regulationsmechanismen über allosterische Regulation oder kovalente Modifizierung unterliegen.

Desweiteren können Mutanten hergestellt werden, die eine veränderte Substratspezifität aufweisen. Weiterhin können Mutanten hergestellt werden, die ein verändertes Aktivitäts-Temperatur-Profil aufweisen.

- 5 Für die gentechnische Modifikation prokaryontischer Zellen können die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle oder Teile dieser Moleküle in Plasmide eingebracht werden, die eine Mutagenese oder eine Sequenzveränderung durch Rekombination von DNA-Sequenzen erlauben. Mit Hilfe von Standardverfahren (vgl. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A laboratory manual, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA) können Basenaustausche vorgenommen oder natürliche oder synthetische Sequenzen hinzugefügt werden. Für die Verbindung der DNA-Fragmente untereinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden. Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen zur Verfügung stellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen in Frage kommen, können in vitro-Mutagenese, "primer repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Als Analysemethoden werden im allgemeinen Sequenzanalyse, Restriktionsanalyse oder weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden durchgeführt.

- 20 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Wirtszellen, insbesondere pro- oder eukaryontische Zellen, die mit einem oben beschriebenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül oder einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert sind, sowie Zellen, die von derart transformierten Zellen abstammen und ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül oder einen Vektor enthalten. Dabei handelt es sich vorzugsweise um pro- oder eukaryontische, insbesondere um pflanzliche Zellen.

- 30 Gegenstand der Erfindung sind ferner rekombinant herstellbare Proteine mit der Aktivität einer Isoamylase, die durch die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle

codiert werden, sowie Verfahren zu deren Herstellung, worin eine erfindungsgemäße Wirtszelle unter dem Fachmann bekannten, geeigneten Bedingungen kultiviert wird, die die Synthese des erfindungsgemäßen Proteins erlauben, und es anschließend aus den Wirtszellen und/oder dem Kulturmedium isoliert wird.

- 5 Durch die Bereitstellung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle ist es nun möglich, mit Hilfe gentechnischer Methoden in den Stärkemetabolismus von Pflanzen gezielt einzugreifen und ihn dahingehend zu verändern, daß es zur Synthese einer modifizierten Stärke kommt, die in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, beispielsweise dem Amylose/Amylopektin-Verhältnis, dem Verzweigungsgrad, der durchschnittlichen Kettenlänge, dem Phosphatgehalt, dem Verkleisterungsverhalten, den Gel- oder Filmbildungseigenschaften, der Stärkekorngröße und/oder der Stärkekornform im Vergleich zu bekannter Stärke verändert ist.

- 5 Möglich ist somit die Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in pflanzlichen Zellen, um die Aktivität der entsprechenden Isoamylase zu erhöhen, oder die Einführung in Zellen, die dieses Enzym natürlicherweise nicht exprimieren. Ferner ist es möglich, die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle nach dem Fachmann bekannten Methoden zu modifizieren, um erfindungsgemäße Isoamylasen zu erhalten, die nicht mehr den natürlichen zelligen Regulationsmechanismen unterliegen, bzw. veränderte Temperatur-Aktivitätsprofile oder Substrat- bzw. Produktspezifitäten aufweisen.

- 5 Bei der Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in Pflanzen besteht grundsätzlich die Möglichkeit, daß das synthetisierte Protein in jedem beliebigen Kompartiment der pflanzlichen Zelle lokalisiert sein kann. Um die Lokalisation in einem bestimmten Kompartiment zu erreichen, muß die Lokalisation in Plastiden gewährende Sequenz deletiert werden und die verbleibende codierende Region gegebenenfalls mit DNA-Sequenzen verknüpft werden, die die Lokalisierung in dem jeweiligen Kompartiment gewährleisten.

Derartige Sequenzen sind bekannt (siehe beispielsweise Braun et al., EMBO J. 11 (1992), 3219-3227; Wolter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 846-850; Sonnewald et al., Plant J. 1 (1991), 95-106).

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch transgene Pflanzenzellen, die mit einem erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül oder Vektor transformiert wurden, sowie transgene Pflanzenzellen, die von derartig transformierten Zellen abstammen. Derartige Zellen enthalten ein oder mehrere erfindungsgemäße Nucleinsäuremoleküle, wobei diese vorzugsweise mit regulatorischen DNA-Elementen verknüpft sind, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten, insbesondere mit einem geeigneten Promotor. Derartige Zellen lassen sich von natürlicherweise vorkommenden Pflanzenzellen unter anderem dadurch unterscheiden, daß sie ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül enthalten, das natürlicherweise in diesen Zellen nicht vorkommt oder dadurch, daß ein solches Molekül an einem Ort im Genom der Zelle integriert vorliegt, an dem es sonst nicht vorkommt, d.h. in einer anderen genomischen Umgebung. Ferner lassen sich derartige erfindungsgemäße transgene Pflanzenzellen von natürlicherweise vorkommenden Pflanzenzellen dadurch unterscheiden, daß sie mindestens eine Kopie eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls stabil integriert in ihr Genom enthalten, gegebenenfalls zusätzlich zu natürlicherweise in den Zellen vorkommenden Kopien eines solchen Moleküls. Handelt es sich bei dem (den) in die Zellen eingeführten Nucleinsäuremolekül(en) um zusätzliche Kopien zu bereits natürlicherweise in den Zellen vorkommenden Molekülen, so lassen sich die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen von natürlicherweise vorkommenden insbesondere dadurch unterscheiden, daß diese zusätzliche(n) Kopie(n) an Orten im Genom lokalisiert ist(sind) an denen sie natürlicherweise nicht vorkommt(vorkommen). Dies läßt sich beispielsweise mit Hilfe einer Southern Blot-Analyse nach dem Fachmann bekannten Verfahren einfach überprüfen.

- 30 Ist das in das pflanzliche Genom eingeführte erfindungsgemäße

Nucleinsäuremolekül heterolog in Bezug auf die Pflanzenzelle, so weisen die transgenen Pflanzenzellen Transkripte der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle auf, die sich z. B. durch Northern-Blot-Analyse nach dem Fachmann bekannten Verfahren einfach nachweisen lassen.

Das eingeführte erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül homolog in Bezug auf die Pflanzenzelle, können die erfindungsgemäßen Zellen von natürlicherweise vorkommenden beispielsweise aufgrund der zusätzlichen Expression

erfindungsgemäßer Nucleinsäuremoleküle unterschieden werden. Die transgenen Pflanzenzellen enthalten vorzugsweise mehr Transkripte der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle. Dies kann z. B. durch Northern-Blot-Analyse nachgewiesen werden. "Mehr" bedeutet dabei vorzugsweise mindestens 10% mehr, bevorzugt mindestens 20% mehr und besonders bevorzugt mindestens 50% mehr Transkripte als entsprechende, nicht-transformierte Zellen. Vorzugsweise weisen die Zellen einer erfindungsgemäßen (mindestens 10%, 20% bzw. 50%ige) Aktivitätssteigerung 3 erfindungsgemäßen Proteins auf. Die transgenen Pflanzenzellen können nach dem Fachmann bekannten Techniken zu ganzen Pflanzen regeneriert werden.

Die durch Regeneration der erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen hergestellten Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ferner sind Gegenstand der Erfindung Pflanzen, die die oben beschriebenen transgenen Pflanzenzellen enthalten. Bei den transgenen Pflanzen kann es sich prinzipiell um Pflanzen jeder beliebigen Pflanzenspezies handeln, d.h. sowohl monokotyle als auch dikotyle Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um Nutzpflanzen, vorzugsweise stärke synthetisierende bzw. stärke speichernde Pflanzen, besonders bevorzugt Getreide, Gerste, Hafer, Weizen, Hirse, Sago, Mais, Reis, Erbse, Markerbse, Maniok, Kartoffel, Tomate, Raps, Sojabohne, Hanf, Flachs, Sonnenblume, Kukurbit oder Rowroot, insbesondere Weizen, Mais, Reis und Kartoffel.

Die Erfindung betrifft ebenfalls Vermehrungsmaterial der erfindungsgemäßen Pflanzen, beispielsweise Früchte, Samen, Knollen, Wurzelstücke, Sämlinge,

Stecklinge, Calli, Protoplasten, Zellkulturen etc..

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke umfassend den Schritt der Extraktion der Stärke aus einer oben beschriebenen erfindungsgemäßen Pflanze und/oder aus stärke speichernden Teilen einer solchen Pflanze.

Verfahren zur Extraktion der Stärke von Pflanzen oder von stärke speichernden Teilen von Pflanzen, insbesondere aus Weizen, sind dem Fachmann bekannt, vgl. z.B. Eckhoff et al. (Cereal Chem. 73 (1996) 54-57) "Starch: Chemistry and Technology" (Hrsg.: Whistler, BeMiller und Paschall (1994), 2. Ausgabe, Academic Press Inc. London Ltd. ISBN 0-12-746270-8; siehe z. B. Kapitel XII, Seite 412-468: Mais und Sorghum-Stärken; Herstellung: von Watson; Kapitel XII, Seite 469-479: Tapioca-, Arrowroot- und Sagostärken; Herstellung: von Corbishley und Miller; Kapitel XIV, Seite 479-490: Kartoffelstärke; Herstellung und Verwendungen: von Milch; Kapitel XV, Seite 491 bis 506: Weizenstärke; Herstellung, Modifizierung und Verwendungen: von Knight und Oson; und Kapitel XVI, Seite 507 bis 528: Reisstärke; Herstellung und Verwendungen: von Rohmer und Klem). Vorrichtungen, die für gewöhnlich bei Verfahren zur Extraktion von Stärke von Pflanzenmaterial verwendet werden, sind Separatoren, Dekanter, Hydrocyclone, Sprühtrockner und Wirbelschichttrockner.

Die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisieren aufgrund der Expression eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls eine Stärke, die in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, z.B. dem Amylose/Amylopektin-Verhältnis, dem Verzweigungsgrad, der durchschnittlichen Kettenlänge, dem Phosphorgehalt, dem Verkleisterungsverhalten, der Stärkekorngröße und/oder der Stärkekornform im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke verändert ist. Insbesondere kann eine solche Stärke im Hinblick auf die Viskosität und/oder die Film- oder Gelbildungseigenschaften von

Kleinsten dieser Stärke im Vergleich zu bekannten Stärken verändert sein.

- Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner eine Stärke, die aus den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen, Pflanzen sowie deren Vermehrungsmaterial erhältlich ist und Stärke, die durch das oben beschriebene erfindungsgemäße Verfahren erhältlich ist.

- Ferner ist es möglich, mit Hilfe der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle Pflanzenzellen und Pflanzen zu erzeugen, bei denen die Aktivität eines erfindungsgemäßen Proteins verringert ist. Dies führt ebenfalls zur Synthese einer Stärke mit veränderten chemischen und/oder physikalischen Eigenschaften verglichen mit Stärke aus Wildtyp-Pflanzenzellen.

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist somit auch ein transgene Pflanzenzelle, enthaltend ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül, in der die Aktivität einer Isoamylase im Vergleich zu nicht-transformierten Zellen reduziert ist.

- Die Herstellung von Pflanzenzellen mit einer verringerten Aktivität einer Isoamylase kann beispielsweise erzielt werden durch die Expression einer entsprechenden antisense-RNA, einer sense-RNA zur Erzielung eines Cosuppressionseffektes oder die Expression eines entsprechend konstruierten Ribozyms, das spezifisch Transkripte spaltet, die eine Isoamylase codieren, unter Verwendung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle nach dem Fachmann bekannten Verfahren, vgl. Jorgensen (Trends Biotechnol. 8 (1990), 340-344), Niebel et al., (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 91-103), Flavell et al. (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 43-46), Palaqui und Vaucheret (Plant. Mol. Biol. 29 (1995), 149-159), Vaucheret et al. (Mol. Gen. Genet. 248 (1995), 311-317), de Borne et al. (Mol. Gen. Genet. 243 (1994), 613-621).

- Vorzugsweise wird zur Reduzierung der Aktivität einer erfindungsgemäßen Isoamylase in den pflanzlichen Zellen die Anzahl der sie codierenden Transkripte

reduziert, z.B. durch Expression einer antisense-RNA.

- Hierzu kann zum einen ein DNA-Molekül verwendet werden, das die gesamte für ein erfindungsgemäßes Protein codierende Sequenz einschließlich eventuell vorhandener flankierender Sequenzen umfasst, als auch DNA-Moleküle, die nur Teile der codierenden Sequenz umfassen, wobei diese Teile lang genug sein müssen, um in den Zellen einen antisense-Effekt zu bewirken. Es können im allgemeinen Sequenzen bis zu einer Mindestlänge von 15 bp, vorzugsweise einer Länge von 100-500 bp, für eine effiziente antisense-Inhibition insbesondere Sequenzen mit einer Länge über 500 bp verwendet werden. In der Regel werden DNA-Moleküle verwendet, die kürzer als 5000 bp, vorzugsweise Sequenzen, die kürzer als 2500 bp sind.

- Möglich ist auch die Verwendung von DNA-Sequenzen, die einen hohen Grad an Homologie zu den Sequenzen der erfindungsgemäßen DNA-Moleküle aufweisen, aber nicht vollkommen identisch sind. Die minimale Homologie sollte größer als ca. 65 % sein. Die Verwendung von Sequenzen mit Homologien zwischen 95 und 100 % ist zu bevorzugen.

- Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke umfassend den Schritt der Extraktion der Stärke aus einer erfindungsgemäßen Zelle oder Pflanze und/oder aus stärke-speichernden Teilen einer solchen Pflanze.

- Gegenstand der Erfindung ist ferner eine Stärke, die aus den erfindungsgemäßen Zellen, Pflanzen sowie Vermehrungsmaterial oder deren Teilen erhältlich ist sowie Stärke, die durch ein erfindungsgemäßes Verfahren erhältlich ist.

- Die erfindungsgemäßen Stärken können nach dem Fachmann bekannten Verfahren modifiziert werden und eignen sich in unmodifizierter oder modifizierter Form für

verschiedene Verwendungen im Nahrungsmittel- oder Nicht-Nahrungsmittelbereich.

Grundsätzlich lassen sich die Einsatzmöglichkeiten der erfindungsgemäßen Stärken in zwei große Bereiche unterteilen. Der eine Bereich umfaßt die Hydrolyseprodukte der Stärke, hauptsächlich Glucose und Glucanbausteine, die über enzymatische oder chemische Verfahren erhalten werden. Sie dienen als Ausgangsstoff für weitere chemische Modifikationen und Prozesse, wie Fermentation. Für eine Reduktion der Kosten kann hierbei die Einfachheit und kostengünstige Ausführung eines Hydrolyseverfahrens von Bedeutung sein. Gegenwärtig verläuft es im wesentlichen enzymatisch unter Verwendung von Amyloglucosidase. Vorstellbar wäre eine Kosteneinsparung durch einen geringeren Einsatz von Enzymen. Eine Strukturveränderung der Stärke, z.B. Oberflächenvergrößerung des Korns, leichtere Verdaulichkeit durch z.B. geringeren Verzweigungsgrad oder eine sterische Struktur, die die Zugänglichkeit für die eingesetzten Enzyme begrenzt, könnte dies bewirken.

Der andere Bereich, in dem die erfindungsgemäßen Stärken wegen ihrer polymeren Struktur als sogenannte native Stärke verwendet wird, gliedert sich in zwei weitere Einsatzgebiete:

1. Nahrungsmittelindustrie

Stärke ist ein klassischer Zusatzstoff für viele Nahrungsmittel, bei denen sie im wesentlichen die Funktion des Bindens von wäßrigen Zusatzstoffen übernimmt bzw. eine Erhöhung der Viskosität oder aber eine erhöhte Gelbildung hervorruft. Wichtige Eigenschaftsmerkmale sind das Fließ- und Sorptionsverhalten, die Quell- und Verkleisterungstemperatur, die Viskosität und Dickungsleistung, die Löslichkeit der Stärke, die Transparenz und Kleisterstruktur, die Hitze-, Scher- und Säurestabilität, die Neigung zur Retrogradation, die Fähigkeit zur Filmbildung, die Gefrierstabilität, die Viskositätsstabilität in Satzlösungen, die Verdaulichkeit sowie die Fähigkeit

zur Komplexbildung mit z.B. anorganischen oder organischen Ionen.

2. Nicht-Nahrungsmittelindustrie

In diesem großen Bereich kann die Stärke als Hilfsstoff für unterschiedliche Herstellungsprozesse bzw. als Zusatzstoff in technischen Produkten eingesetzt. Bei der Verwendung der Stärke als Hilfsstoff ist hier insbesondere die Papier- und Pappeindustrie zu nennen. Die Stärke dient dabei in erster Linie zur Retardation (Zurückhaltung von Feststoffen), der Abbindung von Füllstoff- und Feinstoffeichen, als Festigungsstoff und zur Entwässerung. Darüber hinaus werden die günstigen Eigenschaften der Stärke in bezug auf die Steifigkeit, die Härte, den Klang, den Griff, den Glanz, die Glätte, die Spaltfestigkeit sowie die Oberflächen ausgenutzt.

2.1 Papier- und Pappeindustrie

Innerhalb des Papierherstellungsprozesses sind vier Anwendungsbereiche, nämlich Oberfläche, Strich, Masse und Sprühen, zu unterscheiden. Die Anforderungen an die Stärke in bezug auf die Oberflächenbehandlung sind im wesentlichen ein hoher Weißgrad, eine angepaßte Viskosität, eine hohe Viskositätsstabilität, eine gute Filmbildung sowie eine geringe Staubbildung. Bei der Verwendung im Strich spielt der Feststoffgehalt, eine angepaßte Viskosität, ein hohes Bindevermögen sowie eine hohe Pigmentaffinität eine wichtige Rolle. Als Zusatz zur Masse ist eine rasche, gleichmäßige, verlustfreie Verteilung, eine hohe mechanische Stabilität und eine vollständige Zurückhaltung im Papierfluß von Bedeutung. Beim Einsatz der Stärke im Sprühbereich sind ebenfalls ein angepaßter Feststoffgehalt, hohe Viskosität sowie ein hohes Bindevermögen von Bedeutung.

2.2 Klebstoffindustrie

Ein großer Einsatzbereich der Stärken besteht in der Klebstoffindustrie, wo man die Einsatzmöglichkeiten in vier Teilbereiche gliedert: die Verwendung

als reinem Stärkeleim, die Verwendung bei mit speziellen Chemikalien aufbereiteten Stärkeleimen, die Verwendung von Stärke als Zusatz zu synthetischen Harzen und Polymerdispersionen sowie die Verwendung von Stärken als Streckmittel für synthetische Klebstoffe. 90 % der Klebstoffe auf Stärkebasis werden in den Bereichen Wellpappenherstellung, Herstellung von Papiersäcken, Beuteln und Tüten, Herstellung von Verbundmaterialien für Papier und Aluminium, Herstellung von Kartonagen und Wiederbefeuchtungslern für Briefumschläge, Briefmarken usw. eingesetzt.

10 2.3 Textil- und Textilpflegeindustrie

Ein großes Einsatzfeld für die Stärken als Hilfsmittel und Zusatzstoff ist der Bereich Herstellung von Textilien und Textilpflegemitteln. Innerhalb der Textilindustrie sind die folgenden vier Einsatzbereiche zu unterscheiden: Der Einsatz der Stärke als Schlichtmittel, d.h. als Hilfsstoff zur Glättung und Stärkung des Klettverhaltens zum Schutz gegen die beim Weben angreifenden Zugkräfte sowie zur Erhöhung der Abriebfestigkeit beim Weben, Stärke als Mittel zur Textilaufüstung vor allem nach qualitätsverschlechternden Vorbehandlungen, wie Bleichen, Färben usw., Stärke als Verdickungsmittel bei der Herstellung von Farbpasten zur Verhinderung von Farbstoffdiffusionen sowie Stärke als Zusatz zu Kettungsmitteln für Nähgarne.

20 2.4 Baustoffindustrie

Der vierte Einsatzbereich ist die Verwendung der Stärken als Zusatz bei Baustoffen. Ein Beispiel ist die Herstellung von Gipskartonplatten, bei der die im Gipsbrei vermischte Stärke mit dem Wasser verkleistert, an die Oberfläche der Gipsplatte diffundiert und dort den Karton an die Platte bindet. Weitere Einsatzbereiche sind die Beimischung zu Putz- und Mineralfasern. Bei Transportbeton werden Stärkeprodukte zur Verzögerung der Abbindung eingesetzt.

2.5 Bodenstabilisation

Ein weiterer Markt für die Stärke bietet sich bei der Herstellung von Mitteln zur Bodenstabilisation an, die bei künstlichen Erdbewegungen zum temporären Schutz der Bodenpartikel gegenüber Wasser eingesetzt werden. Kombinationsprodukte aus der Stärke und Polymeremulsionen sind nach heutiger Kenntnis in ihrer Erosions- und verkrustungsminimierenden Wirkung den bisher eingesetzten Produkten gleichzusetzen, liegen preislich aber deutlich unter diesen.

10 2.6 Einsatz in Pflanzenschutz- und Düngemitteln

Ein Einsatzbereich liegt in der Verwendung der Stärke in Pflanzenschutzmitteln zur Veränderung der spezifischen Eigenschaften der Präparate. So kann die Stärke zur Verbesserung der Benetzung von Pflanzenschutz- und Düngemitteln, zur dosierten Freigabe der Wirkstoffe, zur Umwandlung flüssiger, flüchtiger und/oder überlebensfähiger Wirkstoffe in mikrokristalline, stabile, formbare Substanzen, zur Mischung inkompatibler Verbindungen und zur Verlängerung der Wirkdauer durch Verminderung der Zersetzung eingesetzt werden.

20 2.7 Pharmaka, Medizin und Kosmetikindustrie

Ein weiteres Einsatzgebiet besteht im Bereich der Pharmaka, Medizin und Kosmetikindustrie. In der pharmazeutischen Industrie kann die Stärke als Bindemittel für Tabletten oder zur Bindemittelverdünnung in Kapseln eingesetzt werden. Weiterhin kann die Stärke als Tablettenpressmittel dienen, da sie nach dem Schmelzen Flüssigkeit absorbieren und nach kurzer Zeit sowie Quellen, daß der Wirkstoff freigesetzt wird. Medizinische Gleit- und Wundpuder basieren aus qualitativen Gründen auf Stärke. Im Bereich der Kosmetik werden Stärken beispielsweise als Träger von Puderzusatzstoffen, wie Düften und Salicylsäure eingesetzt. Ein relativ großer Anwendungsbereich für die Stärke liegt bei Zahnpasta.

2.8 Stärkezusatz zu Kohlen und Briquets

Einen Einsatzbereich bietet die Stärke als Zusatzstoff zu Kohle und Briquet. Kohle kann mit einem Stärkezusatz quantitativ hochwertig agglomeriert bzw. briquetiert werden, wodurch ein frühzeitiges Zerfallen der Briquets verhindert wird. Der Stärkezusatz liegt bei Grillkohle zwischen 4 und 6 %, bei kalorierter Kohle zwischen 0,1 und 0,5 %. Des weiteren gewinnen Stärken als Bindemittel an Bedeutung, da durch ihren Zusatz zu Kohle und Briquet der Ausstoß schädlicher Stoffe deutlich vermindert werden kann.

2.9 Erz- und Kohleschlamm aufbereitung

Die Stärke kann ferner bei der Erz- und Kohleschlamm aufbereitung als Flockungsmittel eingesetzt werden.

2.10 Gießereihilfsstoff

Ein weiterer Einsatzbereich besteht als Zusatz zu Gießereihilfsstoffen. Bei verschiedenen Gußverfahren werden Kerne benötigt, die aus Bindemittelversetzten Sänden hergestellt werden. Als Bindemittel wird heute überwiegend Bentonit eingesetzt, das mit modifizierten Stärken, meist Quellstärken, versetzt ist.

Zweck des Stärkezusatzes ist die Erhöhung der Fließfestigkeit sowie die Verbesserung der Bindefestigkeit. Darüber hinaus können die Quellstärken weitere produktionstechnische Anforderungen, wie im kalten Wasser dispergierbar, rehydrierbar, gut in Sand mischbar und hohes Wasserbindungsvermögen, aufweisen.

2.11 Einsatz in der Kautschukindustrie

In der Kautschukindustrie kann die Stärke zur Verbesserung der technischen und optischen Qualität eingesetzt werden. Gründe sind dabei die Verbesserung des Oberflächenglanzes, die Verbesserung des Griffs und des Aussehens, dafür wird Stärke vor der Kaltvulkanisation auf die klebrigen

gummierten Flächen von Kautschukstoffen gestreut, sowie die Verbesserung der Bedruckbarkeit des Kautschuks.

2.12 Herstellung von Lederersatzstoffen

Eine weitere Absatzmöglichkeit der modifizierten Stärken besteht bei der Herstellung von Lederersatzstoffen.

2.13 Stärke in synthetischen Polymeren

Auf dem Kunststoffsektor zeichnen sich folgende Einsatzgebiete ab: die Einbindung von Stärkefolgeprodukten in den Verarbeitungsprozess (Stärke ist nur Füllstoff, es besteht keine direkte Bindung zwischen synthetischem Polymer und Stärke) oder alternativ die Einbindung von Stärkefolgeprodukten in die Herstellung von Polymeren (Stärke und Polymer gehen eine feste Bindung ein).

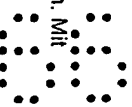
15

Die Verwendung der Stärke als reinem Füllstoff ist verglichen mit den anderen Stoffen wie Talkum nicht wettbewerbsfähig. Anders sieht es aus, wenn die spezifischen Stärkeigenschaften zum Tragen kommen und hierdurch das Eigenschaftsprofil der Endprodukte deutlich verändert wird. Ein Beispiel hierfür ist die Anwendung von Stärkeprodukten bei der Verarbeitung von Thermoplasten, wie Polyethylen. Hierbei werden die Stärke und das synthetische Polymer durch Koexpression im Verhältnis von 1 : 1 zu einem 'master batch' kombiniert, aus dem mit granuliertem Polyethylen unter Anwendung herkömmlicher Verfahrenstechniken diverse Produkte hergestellt werden. Durch die Einbindung von Stärke in Polyethylenfolien kann eine erhöhte Stoffdurchlässigkeit bei Hohlkörpern, eine verbesserte Wasserdampfdurchlässigkeit, ein verbessertes Antistatverhalten, ein verbessertes Antiblockverhalten sowie eine verbesserte Bedruckbarkeit mit wässrigen Farben erreicht werden.

25

30

Eine andere Möglichkeit ist die Anwendung der Stärke in Polyurethanschäumen. Mit



- der Adaption der Stärkederivate sowie durch die verfahrenstechnische Optimierung ist es möglich, die Reaktion zwischen synthetischen Polymeren und den Hydroxygruppen der Stärken gezielt zu steuern. Das Ergebnis sind Polyurethanfolien, die durch die Anwendung von Stärke folgende Eigenschaftsprofile erhalten: eine Verringerung des Wärmeausdehnungskoeffizienten, Verringerung des Schrumpfverhaltens, Verbesserung des DruckSpannungsverhaltens, Zunahme der Wasserdampfdurchlässigkeit ohne Veränderung der Wasseraufnahme, Verringerung der Entflammbarkeit und der Aufrißdichte, kein Abtropfen brennbarer Teile, Halogenfreiheit und verminderte Alterung. Nachteile, die gegenwärtig noch vorhanden sind, sind verringerte Druckfestigkeit sowie eine verringerte Schlagfestigkeit.

- Die Produktentwicklung beschränkt sich inzwischen nicht mehr nur auf Folien. Auch feste Kunststoffprodukte, wie Töpfe, Platten und Schalen, sind mit einem Stärkegehalt von über 50 % herzustellen. Desweiteren sind Stärke/Polymereismischungen günstig zu beurteilen, da sie eine sehr viel höhere biologische Abbaubarkeit aufweisen.

- Außerordentliche Bedeutung haben weiterhin auf Grund ihres extremen Wasserbindungsvermögens Stärkepfropfpolymerisate gewonnen. Dies sind Produkte mit einem Rückgrat aus Stärke und einer nach dem Prinzip des Radikalkettenmechanismus aufgepfropften Seitenglieders eines synthetischen Monomers. Die heute verfügbaren Stärkepfropfpolymerisate zeichnen sich durch ein besseres Binde- und Rückhaltevermögen von bis zu 1000 g Wasser pro g Stärke bei hoher Viskosität aus. Die Anwendungsbereiche für diese Superabsorber haben sich in den letzten Jahren stark ausgeweitet und liegen im Hygienebereich mit Produkten wie Windeln und Unterlagen sowie im landwirtschaftlichen Sektor, z.B. bei Saatgutpflanzungen.

- Entscheidend für den Einsatz der neuen, gentechnisch veränderten Stärken sind zum einen die Struktur, Wassergehalt, Proteingehalt, Lipidgehalt, Fasergehalt,

- Asche/Phosphatgehalt, Amylose/Amylopektinverhältnis, Molmassenverteilung, Verzweigungsgrad, Korngröße und -form sowie Kristallinität, zum anderen auch die Eigenschaften, die in folgende Merkmale münden: Fließ- und Sorptionsverhalten, Verkleisterungstemperatur, Viskosität, Viskositätsstabilität in Salzlösungen, Dickungsleistung, Löslichkeit, Kleisterstruktur und -transparenz, Hitze-, Scher- und Säurestabilität, Retrogradationsneigung, Gelbildung, Gefrier/Taufstabilität, Komplexbildung, Jodbindung, Filmbildung, Klebekraft, Enzymstabilität, Verdaulichkeit und Reaktivität.

- Die Erzeugung modifizierter Stärken mittels gentechnischer Verfahren kann zum einen die Eigenschaften der aus der Pflanze gewonnenen Stärke dahingehend verändern, daß weitere Modifikationen mittels chemischer oder physikalischer Verfahren nicht mehr notwendig erscheinen. Zum anderen können die durch gentechnische Verfahren veränderte Stärken weiteren chemischen Modifikationen unterworfen werden, was zu weiteren Verbesserungen der Qualität für bestimmte der oben beschriebenen Einsatzgebiete führt. Diese chemischen Modifikationen sind grundsätzlich bekannt. Insbesondere handelt es sich dabei um Modifikationen durch Hitzebehandlung, Behandlung mit organischen oder anorganischen Säuren, Oxidation und Veresterungen, welche z.B. zur Entstehung von Phosphat-, Nitrat-, Sulfat-, Xanthat-, Acetat- und Citratstärken führen. Desweiteren können ein- oder mehrwertige Alkohole in Gegenwart starker Säuren zur Erzeugung von Stärkeethern eingesetzt werden, so daß Stärke-Alkylether, O-Allylether, Hydroxyalkylether, O-Carboxymethylether, N-haltige Stärkeether, P-haltige Stärkeether, S-haltige Stärkeether, vernetzte Stärken oder Stärke-Pfropf-Polymerisate resultieren.
- Eine bevorzugte Verwendung der erfindungsgemäße Stärken liegt in der Herstellung von Verpackungsmaterial und Einwegartikeln.

- Zur Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in sense- oder antisense-Orientierung in pflanzlichen Zellen werden diese mit regulatorischen

DNA-Elementen verknüpft, die die Transkription in pflanzlichen Zellen

gewährleisten. Hierzu zählen insbesondere Promotoren. Generell kommt für die Expression jeder in pflanzlichen Zellen aktive Promotor in Frage.

Der Promotor kann dabei so gewählt sein, daß die Expression konstitutiv erfolgt oder nur in einem bestimmten Gewebe, zu einem bestimmten Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung oder zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt. In Bezug auf die Pflanze kann der Promotor homolog oder heterolog sein. Sinnvolle Promotoren sind z.B. der Promotor der 35S RNA des Cauliflower Mosaic Virus und der Ubiquitin-Promotor aus Mais für eine konstitutive Expression, der Atalungen-Promotor B33 (Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) für eine rollenspezifische Expression in oder ein Promotor, der eine Expression lediglich in photosynthetisch aktiven Geweben sicherstellt, z.B. der ST-LS1-Promotor Stockhaus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 7943-7947, Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445-2451) oder für eine endosperm-spezifische Expression der HMG-Promotor aus Weizen, der USP-Promotor, der Phaseolinpromotor oder Promotoren von Zein-Genen aus Mais.

erner kann eine Terminationssequenz vorhanden sein, die der korrekten Beendigung der Transkription dient sowie der Addition eines Poly-A-Schwanzes an das Transkript, dem eine Funktion bei der Stabilisierung der Transkripte beigegeben wird. Derartige Elemente sind in der Literatur beschrieben (vgl. Gielen et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) und sind beliebig austauschbar.

Die vorliegende Erfindung stellt Nucleinsäuremoleküle zur Verfügung, die ein Protein mit der Funktion einer Isoamylase aus Weizen codieren. Die erfundungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle erlauben die Herstellung dieses Enzyms, dessen funktionale Identifizierung innerhalb der Stärkebiosynthese, die Herstellung gentechnisch veränderter Pflanzen, bei denen die Aktivität dieses Enzyms verändert ist und ermöglicht somit die Synthese einer Stärke mit veränderter Struktur und veränderten physikalisch-chemischen Eigenschaften in

derartig modifizierten Pflanzen.

Die erfundungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können prinzipiell auch dazu verwendet werden, Pflanzen herzustellen, in denen die Aktivität der erfundungsgemäßen Isoamylase erhöht oder verringert ist und gleichzeitig die Aktivitäten anderer, an der Stärkesynthese beteiligter Enzyme verändert sind. Durch die Veränderung der Aktivitäten einer Isoamylase in Pflanzen kommt es zur Synthese einer in ihrer Struktur veränderten Stärke. Ferner können Nucleinsäuremoleküle, die eine Isoamylase codieren oder entsprechende antisense-Konstrukte, in Pflanzenzellen eingebracht werden, bei denen bereits die Synthese endogener Stärkesynthasen oder von Verzweigungsenzymen inhibiert ist (wie z.B. in WO 92/14827 oder Shannon und Garwood, 1984, in Whistler, BeMiller und Paschall, Starch: Chemistry and Technology, Academic Press, London, 2nd Edition: 25-86).

Soll die Inhibierung der Synthese mehrerer an der Stärkebiosynthese beteiligter Enzyme in transformierten Pflanzen erreicht werden, so können DNA-Moleküle zur Transformation verwendet werden, die gleichzeitig mehrere, die entsprechenden Enzyme codierenden Regionen in antisense-Orientierung unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors enthalten. Hierbei kann alternativ jede Sequenz unter der Kontrolle eines eigenen Promotors stehen, oder die Sequenzen können als Fusionsgene von einem gemeinsamen Promotor transkribiert werden bzw. unter der Kontrolle eines gemeinsamen Promotors stehen. Letztere Alternative wird in der Regel vorzuziehen sein, da in diesem Fall die Synthese der entsprechenden Proteine in etwa gleichem Maße inhibiert werden sollte. Für die Länge der einzelnen codierenden Regionen, die in einem derartigen Konstrukt verwendet werden, gilt das, was oben bereits für die Herstellung von antisense-Konstrukten ausgeführt wurde. Eine obere Grenze für die Anzahl der in einem derartigen DNA-Molekül von einem Promotor aus transkribierten antisense-Fragmente gibt es nicht. Das entstehende Transkript sollte aber in der Regel eine Länge von 10 kb, vorzugsweise

von 5 kb nicht überschreiten.

- Codierende Regionen, die in derartigen DNA-Molekülen in Kombination mit anderen codierenden Regionen in antisense-Orientierung hinter einem geeigneten Promotor lokalisiert sind, können aus DNA-Sequenzen stammen, die für folgende Proteine codieren: Stärkekorngelbundene (GBSS I und II) und lösliche Stärkesynthasen (SSS I und II), Verzweigungsenzyme (isoamylasen, Pullulanasen, R-Enzyme, "Branching"-Enzyme, "Debranching"-Enzyme), Stärkephosphorylasen und Disproportionierungsenzyme. Dies ist nur eine beispielhafte Aufzählung. Auch die Verwendung anderer DNA-Sequenzen im Rahmen einer derartigen Kombination ist denkbar.

Mit Hilfe derartiger Konstrukte ist es möglich, in Pflanzenzellen, die mit diesen transformiert wurden, die Synthese mehrerer Enzyme gleichzeitig zu inhibieren.

- Weiterhin können die Konstrukte in pflanzliche Mutanten eingebracht werden, die für ein oder mehrere Gene der Stärkesynthese defekt sind (Shannon und Garwood, 1984, in Whistler, BeMiller und Paschall, Starch: Chemistry and Technology, Academic Press, London, 2nd Edition: 25-86). Diese Defekte können sich auf folgende Proteine beziehen: Stärkekorn-gelbundene (GBSS I und II) und lösliche Stärkesynthasen (SSS I und II), Verzweigungsenzyme (BE I und II), "Debranching"-Enzyme (R-Enzyme), Disproportionierungsenzyme und Stärkephosphorylasen. Dies ist nur eine beispielhafte Aufzählung.

- Mit Hilfe einer derartigen Vorgehensweise ist es weiterhin möglich, in Pflanzenzellen, die mit diesen transformiert wurden, die Synthese mehrerer Enzyme gleichzeitig zu inhibieren.

- Zur Vorbereitung der Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen stehen eine große Anzahl von Klonierungsvektoren zur Verfügung, die ein Replikationssignal für E. coli und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen enthalten.

- Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC184 usw.. Die gewünschte Sequenz kann an einer passenden Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingeführt werden. Das erhaltene Plasmid wird für die Transformation von E. coli-Zellen verwendet. Transformierte E. coli-Zellen werden in einem geeigneten Medium gezüchtet, anschließend geerntet und lysiert. Das Plasmid wird wiedergewonnen. Als Analysemethode zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA werden im allgemeinen Restriktionsanalysen, Gelelektrophoresen und weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden eingesetzt. Nach jeder Manipulation kann die Plasmid-DNA gespalten und gewonnene DNA-Fragmente mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden. Jede Plasmid-DNA-Sequenz kann in den gleichen oder anderen Plasmiden cloniert werden.

- Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von Agrobacterium tumefaciens oder Agrobacterium rhizogenes als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung von DNA mittels der biolistischen Methode sowie weitere Möglichkeiten.

- Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden an sich keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Es können einfache Plasmide wie z.B. pUC-Derivate verwendet werden. Sollen aber aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, ist in der Regel die Anwesenheit eines selektierbaren Markergens notwendig.

- Je nach Einführungsmethode gewünschter Gene in die Pflanzenzelle können weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Werden z.B. für die Transformation der Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so muß mindestens die rechte Begrenzung, häufig jedoch die rechte und linke Begrenzung der Ti- und Ri-Plasmid

DNA als Flankenbereich mit den einzuführenden Genen verbunden werden. erden für die Transformation Agrobakterien verwendet, muß die einzuführende NA in spezielle Plasmide cloniert werden, und zwar entweder in einen intermediären Vektor oder in einen binären Vektor. Die intermediären Vektoren innen aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, urch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien tegriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA wendige vir-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien plazieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf Agrobacterium tumefaciens übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren innen sowohl in E.coli als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein elektionsmarker-Gen und einen Linker oder Polylinker, welche von der rechten und ken T-DNA Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden (Holsters et al. Mol. Gen. Genet. 163 (1978), 11-187). Das als Wirtszelle dienende Agrobacterium soll ein Plasmid, das eine vir-egion trägt, enthalten. Die vir-Region ist für den Transfer der T-DNA in die flanzenzelle notwendig. Zusätzliche T-DNA kann vorhanden sein. Das derartig ansformierte Agrobacterium läßt sich zur Transformation von Pflanzenzellen anwenden.

Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System Offsetdruckerei Kanfers B. V., Ablasserdam (1985), Chapter V; Fraley et al., nt. Rev. Plant. Sci., 4, 1-46 und An et al. EMBO J. 4 (1985), 277-287 beschrieben werden.

Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate weckmaßigerweise mit Agrobacterium tumefaciens oder Agrobacterium izogenes kokultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z.B. atsstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensions-ultivierte Pflanzenzellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches

Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden. Die so erhaltenen Pflanzen können dann auf Anwesenheit der eingeführten DNA untersucht werden. Andere Möglichkeiten der Einführung fremder DNA unter Verwendung des biolistischen Verfahrens oder durch Protoplastentransformation sind bekannt (vgl. z.B. Willmitzer, L., 1993 Transgenic plants. In: Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise (H.J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, eds.), Vol. 2, 627-659, VCH Weinheim-New York-Basel-Cambridge).

Während die Transformation dikotyler Pflanzen über Ti-Plasmid-Vektorsysteme mit Hilfe von Agrobacterium tumefaciens wohl etabliert ist, weisen neuere Arbeiten darauf hin, daß auch monokotyle Pflanzen der Transformation mittels Agrobacterium basierender Vektoren sehr wohl zugänglich sind (Chan et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 491-506; Hiei et al., Plant J. 6 (1994), 271-282).

Alternative Verfahren zur Transformation von monokotylen Pflanzen bestehen mittels des biolistischen Ansatzes, der Protoplastentransformation oder der physikalisch oder chemisch induzierten DNA-Aufnahme in Protoplasten, z.B. durch Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, Transfer von DNA mittels Glasfasern, Makroinjektion von DNA in Blütenstände, die Mikroinjektion von DNA in Mikrosporen oder Pro-Embryonen, die DNA-Aufnahme durch keimenden Pollen und die DNA-Aufnahme in Embryonen durch Quellung (zur Übersicht: Potrykus, Physiol. Plant (1990), 269 – 273).

Drei der oben genannten Transformationssysteme konnten in der Vergangenheit für verschiedene Getreide etabliert werden: die Elektroporation von Gewebe, die Transformation von Protoplasten und der DNA-Transfer durch Partikel-Beschuß in regenerierbare Gewebe und Zellen (zur Übersicht: Jähne et al., Euphytica 85 (1995), 35 – 44).



- Die Transformation von Weizen wird in der Literatur verschiedentlich beschrieben (zur Übersicht: Maheshwari et al., *Critical Reviews in Plant Science* 14 (2) (1995), 149 bis 178); Hess et al. (Plant Sci. 72 (1990), 233) benutzten das Verfahren der Makroinjektion, um Pollen und Agrobakterien in unmittelbare Nähe zu bringen. Die Mobilisierung des Plasmids, daß das *npII* Gen als selektierbaren Marker enthielt, wurde mittels Southern Blot Analyse und NPTII Test nachgewiesen. Die Transformanten zeigten einen normalen Phänotyp und waren fertil. Die Kanamycin-Resistenz konnte in zwei aufeinanderfolgende Generationen nachgewiesen werden. Die erste transgene, fertile Weizenpflanze, die nach Beschluß mit Mikropjektill-gebundener DNA regeneriert werden konnte, wurde von Vasil et al. (BioTechnology 10 (1992), 667 – 674) beschrieben. Das Zielgewebe für den Beschluß war eine embryogene Kalluskultur (Typ C Kallus). Als Selektionsmarker wurde das bar Gen eingesetzt, das eine Phosphinothricin Acetyltransferase codiert und somit eine Resistenz gegen das Herbizid Phosphinothricin vermittelt. Ein weiteres System wurde von Weeks et al. (Plant Physiol. 102 (1993), 1077 – 1084), sowie Becker et al. (Plant J. 5(2) (1994), 299 – 307) beschrieben. Hier ist das Zielgewebe für die DNA-Transformation das Skutellum unreifer Embryonen, das in einer einleitenden in vitro Phase zur Induktion somatischer Embryonen angeregt wurde. Die Effizienz der Transformation liegt bei dem von Becker et al. (loc. cit.) entwickelten System mit 1 transgene Pflanze pro 83 Embryonen der Sorte "Florida" deutlich höher als bei dem von Weeks et al. etablierten System mit 1 bis 2 transgenen Pflanzen pro 1000 Embryonen der Sorte "Bohwhite".
- Das von Becker et al. (loc. cit.) entwickelte System bildet die Basis für die in den Beispielen beschriebenen Transformations-experimente.
- Ist die eingeführte DNA einmal im Genom der Pflanzenzelle integriert, so ist sie dort in der Regel stabil und bleibt auch in den Nachkommen der ursprünglich transformierten Zelle erhalten. Sie enthält normalerweise einen Selektionsmarker, der den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biozid wie Phosphinothricin oder einem Antibiotikum wie Kanamycin, G 418, Bleomycin oder

- Hygromycin vermittelt. Der individuell gewählte Marker sollte daher die Selektion transformierter Zellen gegenüber Zellen gestatten, denen die eingeführte DNA fehlt.
- Die transformierten Zellen wachsen innerhalb der Pflanze in der üblichen Weise (siehe auch McCormick et al., Plant Cell Reports 5 (1986), 81-84). Die resultierenden Pflanzen können normal angezogen werden und mit Pflanzen, die die gleiche transformierte Erbanlage oder andere Erbanlagen besitzen, gekreuzt werden. Die daraus entstehenden hybriden Individuen haben die entsprechenden phänotypischen Eigenschaften. Von den Pflanzenzellen können Samen gewonnen werden. Es sollten zwei oder mehrere Generationen angezogen werden, um sicherzustellen, daß das phänotypische Merkmal stabil beibehalten und vererbt wird. Auch sollten Samen geerntet werden, um sicherzustellen, daß der entsprechende Phänotyp oder andere Eigenarten erhalten geblieben sind.
- Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung illustrieren und stellen keinerlei Beschränkung dar.
1. Clonierungsverfahren
 2. Zur Clonierung in *E. coli* wurde der Vektor pBluescript II SK (Stratagene) verwendet.
 2. Bakterienstämme
- Für den Bluescript-Vektor und für die antisense-Konstrukte wurde der *E. coli* Stamm DH5 α (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, USA) verwendet. Für die in vivo Excision wurde der *E. coli*-Stamm XL1-Blue verwendet.

Transformation unreifer Weizenembryonen

Medien

- 1S: 100 ml/l Makrosalz (D.Becker und H. Lörz,
1 ml/l Mikrosalz Plant Tissue Culture
2 ml/l Fe/NaEDTA Manual (1996), B 12:1-20)
30 g/l Saccharose
- 30: MS + 2,4-D (2 mg/l)
- 31: MS + 2,4-D (2 mg/l) + Phosphinothricin (PPT,
aktive Komponente des
Herbizids BASTA (2 mg/l))
- 32: MS + 2,4-D (0,1 mg/l) + PPT (2 mg/l)
- 39: MS + 2,4-D (2 mg/ml) + je 0,5 N Mannit/Sorbit
- Die angegebenen Medien wurden auf den pH-Wert 5,6 mit KOH eingestellt und mit 3 % Gelatine verfestigt.
- Die Methode zur Transformation unreifer Embryonen aus Weizen wurde von Becker und Lörz (D. Becker und H. Lörz, Plant Tissue Culture Manual (1996), B 12: 1 bis 20) entwickelt und optimiert.
- den nachfolgend beschriebenen Experimenten wurde sich an das von Becker und Lörz (loc. Cit) ausgearbeitete Protokoll gehalten.
- Die Transformation werden Ähren mit Karyopsen der Entwicklungsstufe 12 bis 14

Tage nach Anthesis geerntet und oberflächensterilisiert. Die isolierten Skutella werden mit der dem Medium zugewandten Embryoachse auf Induktionsmedium # 30 plattiert.

- 5 Nach 2 bis 4 tägiger Vorkultur (26°C, dunkel) werden die Explantate auf Medium # 39 zur osmotischen Vorkultur (2 bis 4 h, 26°C, dunkel) umgesetzt.

10 Zur biolistischen Transformation werden pro Schuß ca. 29 µg Goldpartikel, auf die zuvor wenige µg der Ziel-DNA gefällt wurde, eingesetzt. Da es sich bei den durchgeführten Experimenten um Co-Transformanten handelt, wird die Ziel-DNA in einem Verhältnis von 1:1, bestehend aus dem Zielgen und einem Resistenzmarkergen (bar-Gen) dem Fällungsansatz zugegeben.

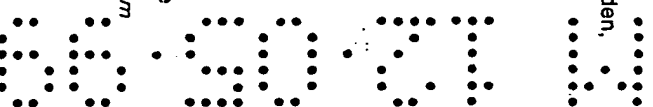
4. DIG-Markierung von DNA-Fragmenten

15 Die Markierung von DNA-Fragmenten, die als Screeningsonden eingesetzt wurden, erfolgte über eine spezifische PCR unter Einbau von DIG-markiertem dUTP (Boehringer Mannheim, Deutschland).

- 20 In den Beispielen verwendete Medien und Lösungen:

20 x SSC 175,3 g NaCl
88,2 g Natrium-Citrat
ad 1000 ml mit ddH₂O
pH 7,0 mit 10 N NaOH

Beispiel 1: Identifizierung, Isolierung und Charakterisierung einer cDNA, die eine Isoamylase (sugary-homolog) aus Weizen (*Triticum aestivum* L., cv Florida) codiert



Zur Identifizierung einer cDNA, die eine Isoform einer Isoamylase (sugary) aus Weizen codiert, wurde die Strategie des heterologen Screening verfolgt. Hierfür wurde eine cDNA-Bank aus Weizen mit einer sugary-Sonde aus Mais durchmuster.

- 5 Die Isolierung der Sonde (sugary-Sonde) aus einer Mais cDNA Bank erfolgte mittels spezifischer Primer durch PCR-Amplifikation. Die Clonierung der Mais cDNA Bank erfolgte aus poly(A) + RNA aus einem Gemisch gleicher Anteile 13, 17, 19, 20, 22, 25 und 28 Tage (DAP) alter Karyopsen in einem Lambda Zap II Vektor analog den Angaben des Herstellers (Lambda ZAP II-cDNA Synthesis Kit Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland). Bei allen verwendeten Karyopsen, außer bei den 13 Tage alten Körnern, war vor der RNA-Isolierung der Embryo entfernt worden.

- 15 Die Amplifizierung des DNA-Fragmentes, das als Sonde zur Durchmusterung der Weizen cDNA Bank eingesetzt wurde, erfolgte mit den folgenden Primern:
 su1-p-1a: 5' AAAGGCCCAATATTATCCTTAGG 3' (Seq.ID No. 4)
 su1-p-2: 5' GCCATTCAACCGTCTGAAGTCGGAAGTC 3' (Seq.ID No. 5)

- 20 Als Template für die PCR-Reaktion wurden 2 µl der amplifizierten Mais cDNA Bank eingesetzt. Die PCR-Reaktion enthielt des weiteren 1,5-3mM MgCl₂, 20mM Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCl, 0,8mM dNTP Mix, 1µM Primer su1-p-1a, 1µM Primer su1-p-2 und 2,5 Units Taq Polymerase (rekombinant, Life Technologies). Die Amplifizierung wurde mit einem Trioblock der Firma Biometra nach dem Schema: 4' (min)/ 95°C; 1' / 95°C; 45' (sek) / 58°C; 1' 15' / 72°C; 30 Cycles 5' / 72°C. Die amplifizierte DNA Bande von ca. 990 bp wurde in einem Agarosegel aufgetrennt und ausgeschnitten. Von diesem Fragment wurde nach dem gleichen Schema wie oben beschrieben eine zweite Amplifizierung durchgeführt. Das aus dieser zweiten Amplifizierung erhaltene 990 bp Fragment wurde mit dem Restriktionsenzym BAM HI in ein 220 bp und ein 770 bp Fragment zerschnitten. Nach nochmaliger Auftrennung des sugary-Fragmentes in

- einem Agarosegel, Ausschneiden der Bande und Isolierung des Fragmentes erfolgte die DIG-Markierung der Sonde. Zur 'random prime' Markierung mit Digoxigenin wurden 500 ng sugary Fragment eingesetzt. Zu dem zu markierenden Fragment wurden 10 µl Random Primer gegeben und die Reaktion wurde 5' bei 95-100°C erhitzt. Nach dem Erwärmen wurden 0,1mM dATP, 0,1mM dGTP, 0,1mM dCTP und 0,065mM dTTP und 0,035 mM Digoxigenin-11-dUTP (Boehringer Mannheim), sowie Klenow Puffer (Standard) und 1 Unit Klenow Polymerase zugegeben. Die Reaktion wurde bei RT (Raumtemperatur) über Nacht durchgeführt. Zur Kontrolle der Markierung wurde ein Dot-Test analog den Angaben des Herstellers ('The DIG System User's Guide for Filter Hybridization' der Firma Boehringer, Mannheim, Deutschland) durchgeführt.

- 15 Die Synthese der Weizen cDNA Bank erfolgte aus poly(A) + RNA von ca. 21 Tage ('starchy'-Endosperm) alten Karyopsen in einen Lambda Zap II Vektor entsprechend den Angaben des Herstellers (Lambda ZAP II-cDNA Synthesis Kit Stratagene GmbH, Heidelberg). Nach Tierbestimmung der cDNA-Bank konnte ein Primärkit von 1,26 x 10⁶ pfu/ml ermittelt werden.

- 20 Zum Durchmustern der Weizen cDNA Bank wurden ca. 350.000 Phagen ausplattiert. Ausplattieren der Phagen und Abziehen der Platten erfolgte nach Standardprotokollen. Die Prähybridisierung und Hybridisierung der Filter wurde in 5X SSC, 3% Blocking (Boehringer, Mannheim), 0,2% SDS, 0,1% Natrium Laurylsarcosin und 50 µg/ml Heringssperma DNA bei 55°C durchgeführt. Der Hybridisierungslösung wurde 1ng/ml der markierten sugary Sonde zugesetzt und die Hybridisierung über Nacht inkubiert. Gewaschen wurden die Filter für 2X5' in 2X SSC, 1% SDS bei RT; 2X 10' in 1X SSC, 0,5% SDS bei 55°C; 2x 10' in 0,5X SSC, 0,2% SDS bei 55°C. Positive Clone wurden durch 2 weitere Screening Runden vereinzelt. Über *in vivo* Excision wurden vereinzelte Clone als pBluescript SK Phagemide erhalten (Durchführung analog den Angaben des Herstellers: Stratagene, Heidelberg, Deutschland).

Nach Analyse der Clone über Minipräparierung und Restringierung der Plasmid-DNA wurde der Clon Tasu-19 weiter analysiert.

Beispiel 2: Sequenzanalyse der cDNA-Insertionen des Plasmids pTABE2

Aus dem Clon Tasu-19 wurde die Plasmid-DNA isoliert und die Sequenz der cDNA-Insertionen mittels der Dideoxynukleotidmethode (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467) bestimmt.

Die Insertion des Clons Tasu-19 ist 2997 bp lang und stellt eine partielle cDNA dar. Die Nucleotidsequenz ist unter Seq ID No. 1 angegeben.

Eine Vergleich mit bereits publizierten Sequenzen zeigte, daß die unter Seq ID No. 1 dargestellte Sequenz neu ist und eine codierende Region umfaßt, die Homologien zu Isoamylasen aus anderen Organismen aufweist.

Die Analyse der Sequenz zeigt auch, daß sich in der cDNA Sequenz zwei Introns in den Positionen 296-396 (Intron 1) und 1617-2144 (Intron 2) befinden.

Werden diese Introns entfernt, läßt sich eine Proteinsequenz ableiten, die Homologien zu den Proteinsequenzen von Isoamylasen anderer Organismen aufweist. Die zu den codierenden Bereichen der Seq ID No. 1 korrespondierende Aminosäure-Sequenz ist unter Seq ID No. 3 dargestellt.

Beispiel 3 Herstellung des Pflanzentransformationsvektors pTa-alpha-su 19

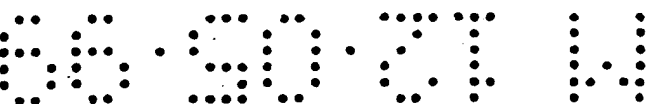
Für die Expression einer antisense-RNA zu der isolierten cDNA aus Weizen wurden auf der Grundlage des Basisplasmids pUC19 der Pflanzentransformationsvektoren pTa-alpha-su19 konstruiert, indem die cDNA-Insertion des Plasmids pTa-alpha-su19 in antisense-Orientierung mit dem 3' Ende des Ubiquitin-Promotors verbunden wurden. Dieser Promotor besteht aus dem ersten untranslatierten Exon und dem ersten Intron des *ubiquitin 1* Gens aus Mais

(Christensen A.H. et al., Plant Molecular Biology 18 (1992), 675-689). Teile des Polylinkers und der NOS-Terminator stammen aus dem Plasmid pAct1.cas (CAMBIA, TG 0063; Cambia, GPO Box 3200, Canberra ACT 2601, Australia). Vektorkonstrukte mit diesem Terminator und Konstrukten, die auf pAct1.cas basieren, sind in MCEIroy et al. (Molecular Breeding 1 (1995), 27-37) beschrieben. Der so entstandene Vektor wird pUbi.cas genannt.

Die Klonierung des Vektors erfolgt durch Restriktion eines 2kb Fragmentes aus dem Clon Ta-su19 mit dem Restriktionsenzym *Xba* I. Das Fragment wurde an den Enden mittels einer Klenow Reaktion aufgefüllt und anschließend in die *Sma* / Klonierungsstelle des Expressionsvektors pUbi.cas ligiert.

Der entstandene Expressionsvektor wird als Ta-alpha-su 19 bezeichnet und wird wie oben beschrieben zur Transformation von Weizen verwendet.

15



SEQUENZENBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 1 (cDNA aus 2997b mit 2 Introns):

60
GGTCGGGGCC GGGCGCGCCG CTGCGACGCT GCGGACCCAA TCGGACGGGG GGGAAAGGGG
5 TCGGCGAGCT GTCCGCCCGG GTTCTCGAGG CCGCGACGAA GGTAGAGGAC GAGGGGAGG
AGGACGAGCC GGTGGCGGAG GACAGGTAGC CGCTCGCGCG CGCTGCGAGG GTGCTCGCCG
10 GAATGCCCGG GCGCGTGGCG GCCACCGCGC TCGCGCGCGG GGTCAATTC GCCGTATTT
CCGCGCGGAG CACCGCGCGG GCGCTGCGC TCTTCACGCC AGAAGATCTC AAGCGGTGG
GGTTGCGCTC CGAGTAGAGT TCATCAGCTT TCGGTGGCG GCGCGCGCTT TTTTGGGCC
15 TCGAATTAA GTTTGTACT GGGGCAATG CTGCGAGATA GGTAGCGA GAGGTTGCC
CTTGACCCCG TGATGAATG GACCGGGAAC GTGTGCGATG TCTTCATCGA AGCGGAGCTG
CACAACATGC TTACGGGGTA CAGGTTGAC GGCACCTTTG CTCTCAGCTG CCGGACATAC
20 CTTGATGTTT CCAATGTGCT GGTGATCTT TATGCTAAG CAGTGAATAG CCGAGGGGAG
TATGTGTTTC CAGCGGTGGG TAACAATTC TGGCTCAGA TGGCTGAGT GATCCCTCTT
660
25 CCAATATGCA CGTTGATG TGAAAGCGAC CTACCTCTAA GATATCTCA AAAGAGCTG
GTAATATATG AGATGCACTT GCGTGGATTC ACGAAGCATG ATTCAAGCAA TGTAAACAT
720
CGCGGTACTT TCATGAGAC TGTGTGAAAG CTGTACTATT TGAAGAGCT TGGAGTTAAT
30 TGTATTAAT TAATGCCCTG CCAATGATTC AACGAGCTGG AGTACTGAAC CTCTCTTCC
900
AAATGAATCT TTTGGGGATA TTCTACATA AACTCTTTT CACCAATGAC AAGATACGA
35 TCAAGCGGGA TAAAAAACTG TGGGGGTGAT GCCATAATG AGTCAAAAC TTTTGTAGA
1020
GAGGCTCACA AACGGGGAAT TGAGGTGATC CTGATGTTG TCTTCAACGA TACAGCTGAG
1080
GGTAATGAGA ATGTGTCAT ATTATCATTT AAGGGGCTCG ATAACTACTAC ATACTATATG
40 CTTGCACCCA AGGAGAGATT TTAACTAT TCTGGCTGCG GGAATACCTT CAAGTAAAT
1200
CATCTGTGCG TTGCTGAAT CATGTAGAT TGTTTAAGAT ACTGGGTGAC GGAATGCAAT
1260
45 GTTATGCTT TTGCTTTTA TCTTGATCC ATATGACCA GAGGTTCCAG TCTGTGGAT
1320
CCAATTAAAG TGTATGAGC TCCAATAGA GGTACATGA TCACAACAGG GACACTCTTT
1380
GTTACTCCAC CACTTATTA CATGATCAGC AATGACCCAA TTCTTGAGG CGTCAAGCTC
50 ATTGCTAAG CATGAGTGC AGAGGCGCTC TATCAAGTAG GTCAATTCCT TCAGTGAAT
1500
CTTGCTGCTG AGTGAATGG GAAATGACCG GACATGTCG GTCAATTCAT TAAAGCACT
1560
35 GATGATTTG CTGTGCTTT TCGCGAATGT CTTTGTGAA GTCCACACT ATACCAAGTA
1620

1680
AGTTGTGCA ATACTGTAA ATGAGTTGAG TGAATGTCAC CTGATTTTT TATATATACC
ACATGATGAT ACACATCTAA ATATATACA ATCATAGTGT ATGCATATGC ATTGGCTAA
5 GAGGATTAG TGTATACACT AGTGTATAT ATAGTTTAA ACACCAACT TCCCATGAA
1800
GGAACATAGG GCTTTCTAGT TATCTTATTT ATTGTCCG TGAATATCC ACTGAAAAAT
1860
10 TCGAGCCATG TCAATTTTAA GGGGGGAGAA AGAACTATA TTGATTTGCC CCCCTAAAG
1920
AAGCATCTC AGAATTCATA GGTAACTTC TTTTCTGTA AGAAGGAAA AGCACTTCAT
1980
15 ACTTCTATC GGTGCTACT TAGCTGATG TATATTTGTA AGATGAATGC CAATTTAAT
2040
TTGTGCGATA ATTGATCTG TTATTCACA ATTCTATTT GTTTCTCTA GAATCAAAC
2100
CAGTAACCTG TTAATGAC TCGAATCTCT TATTGATTA TCAAGCAGAA GGAAGGAAAC
2160
20 CTTGGACAG TATCACTTT GTATGTGAC ATGATGATTT TACACTGGCT GATTGTAA
2220
CATATATTA GAAATACAAAT TTACCAATG GGGAAACAA CAGAGATGA GAAATACAA
2280
25 ATTCTAGCTG GAATGTGGG GAGGAAGAG AATTGCAAG ATTGTCTG AAGATTTGA
2340
GGAAGAGCA GATGCGCAAT TCTTTGTTT GTCTCATGT TTCTCAAGA GTTCAATGT
2400
TCTCATGAGG TGAATATAT GGCACACAA AAGGGGCAA CAACATACA TACTGCCATG
2460
30 ATTCTTATGT CAATTAATTT CGCTGGATA AAAAAAGAA ATACTGTAG TTGACCGAT
2520
TCTGTGCTCT CATGACCAA TTCCCGAAG AGTGGAGGG TCTTGCCCTT GAGGACTTTC
2580
35 CAAGCGCCAA ACGGCTGCG TGCATGCTC ATCACTCTG GAACTGAT TGTCTGAGA
2640
ATAGCGGATT CGTTGCCCTT TGCATGAAG ATGAAGACA GGGGGAATC TATGTGCGCT
2700
TCAACACCGG CCACTTACCG GCCGTGTTG AGCTCCAGA GCGGCGAGG CCGCGGTGG
2760
40 AAGCGGTGCT GACACAGAGC AAGCCAGAC CATAGACTT CCTCAGCGAC GACTTACTG
2820
ATCGGCTCT CACCATACAC CAGTTTCCG ATTCTCTTA CTCAACCTC TACCCATGC
2880
45 TCAGCTACTC ATCGTATC CTAGTATGCG GCCCTGATGT TTGAGAGAC AATATATACA
2940
GTAATTAATA TGTCTATATG TAAAAAAA AA-AAAAAA AAAAAAAA AAAAAA
2997

SEQUENZENBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 3 (Aminosäuresequenz aus 764 Aminosäuren):

SGAPRLRW RPNATAGKV GEVCAVNEA ATVEDEGEE DEPAEDRYA LGACRYLAG 60
MPALGATAL AGVNVFAVS GGATPAALCL FTPEDLKADR VTEEVLPDL NMRIGVWVHV 120

FIEGELHNMML YGVRFDGFTA PHCGHYLDVS NVVVPYAKA VISRGEYVP ARGNNCWPM 180
 AGMPLPYST FDWEGDLPLR YPOKDLIVE MHLRGFTKHD SSNVEHPGT IGAVSKLDYL 240
 KELGVNCEL MPCHFNLE YSTSSKNF WGYSTINFS PMTRYTSGI KNCGRDAINE 300
 KTFVREAHK RGIEVLDV FNHTAEGNEN GPLSRKVD NTTYMLAPK GEFYNSGCG 360
 NTFNCNHPV RQFVDCRLR WTEMHVDFG RFLASIMTR GSSLWDPVNV YGAPLEGOMI 420
 TTGTPLYTPP LIDMISNDPI LGGVKLIAEA WDAGLYOVG QPFWNVWSE WNGKYRDIVR 480
 OPIKGTGFA GGFACLCGS PHLYAGGRK PWHINFCVA HDGFTLADLV TYNKKYNLPN 540
 GENNRDGENH NLSWNCGEEG EFARLSVKRL RKRQMRNFV CLWVSGVPM FYMGDEYHT 600
 KGGNNNTYCH DSYVNYFRWD KKEQYSELHR FCCLMTKFRK ECEGLGLEDF PTAKRLQWHG 660
 HQPGKPDWSE NSRFVAFSMK DEROGEIYVA FNTSHLPVV ELPERAGRRW EPPVDTGKPA 720
 PYDFLTDLCP DRALTHOFS HFLYSMLYPM LSYSSVLVL RPDV 764

Die Aminosäuresequenz ist mittels Einbuchstaben-Code für Aminosäuren dargestellt (vgl. z.B. Stryer, Biochemie, 1990, Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg, ISBN 3-89330-690-0).

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

AAAGCCCCAA TATTATCCTT TAGG

24

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

GCACATTCGA CCGTTCTGAA GTCCGGAGCT C

31

Patentansprüche:

AGR 98/M 206

1. Nucleinsäuremolekül, codierend ein Protein mit der Funktion einer Isoamylase aus Weizen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
 - (a) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, das die unter Seq ID NO. 3 angegebene Aminosäuresequenz umfaßt,
 - (b) Nucleinsäuremolekülen, die die unter Seq ID No. 1 dargestellte Nucleotidsequenz oder Teile davon umfassen oder eine korrespondierende Ribonucleotidsequenz;
 - (c) Nucleinsäuremoleküle, die mit den unter (a) oder (b) genannten Nucleinsäuremolekülen hybridisieren oder komplementär sind, und
 - (d) Nucleinsäuremolekülen, deren Nucleotidsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz der unter (a), (b) oder (c) genannten Nucleinsäuremoleküle abweicht.
2. Nucleinsäuremoleküle nach Anspruch 1, das ein DNA-Molekül ist.
3. DNA-Molekül nach Anspruch 2, das ein cDNA-Molekül ist.
4. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, das ein RNA-Molekül ist.
5. Nucleinsäuremolekül, das spezifisch mit einem Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4 hybridisiert.
6. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 5, das ein Oligonucleotid mit einer Länge von mindestens 15 Nucleotide ist.
7. Vektor, enthaltend ein DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4.

27. Verwendung der Stärke nach Anspruch 18 oder 26 zur Herstellung von Nahrungsmitteln, vorzugsweise von Back- oder Teigwaren.

28. Verwendung der Stärke nach Anspruch 18 oder 26 zur Herstellung von Verpackungsmaterialien oder Einwegartikeln.

Zusammenfassung

AGR 98/M 206

Nucleinsäuremoleküle codierend Enzyme aus Weizen, die an der Stärkesynthese beteiligt sind

5

Es werden Nucleinsäuremoleküle beschrieben, die Enzyme codieren, die an der Stärkesynthese in Pflanzen beteiligt sind. Bei diesen Enzymen handelt es sich um Isoamylasen aus Weizen.

10

Weiterhin betrifft die Erfindung Vektoren und Wirtszellen, die die beschriebenen Nucleinsäuremoleküle enthalten, insbesondere transformierte Pflanzenzellen und aus diesen regenerierbare Pflanzen, die eine gesteigerte oder verringerte Aktivität der erfindungsgemäßen Isoamylasen aufweisen.

49